

## 論文の内容の要旨

論文題目 ホルモン受容体陽性乳癌における Palbociclib の Activin-SMAD  
シグナルへの影響

氏名 原田 真悠水

乳癌の罹患率は年々増加傾向にあり、本邦では女性のがん罹患率のトップを占める。これまで乳癌は遺伝子発現プロファイリングに基づき luminal A、luminal B、HER2-enriched、basal-like、normal breast-like の intrinsic subtype に分類されてきたが、現在の乳癌診療では免疫組織化学的方法を用いた病理組織学検査で得られる estrogen receptor (ER)、progesteron receptor (PgR) の発現と程度、HER2 タンパクの有無、Ki-67 の発現程度により luminal A like、luminal B like、luminal HER2、HER2、triple negative に分類し、治療方針を決定している。luminal A like、luminal B like に相当する hormone receptor (HR)陽性、HER2 陰性乳癌の治療薬として cyclin dependent kinase (CDK) 4/6 阻害薬が近年注目されている。本邦では 2017 年 12 月より CDK4/6 阻害剤のひとつである Palbociclib が HR 陽性、HER2 陰性手術不能または再発乳癌に対して内分泌療法と併用して使用されるようになった。CDK4/6 阻害薬の主な作用機序はサイクリン依存性キナーゼ 4 及び 6 を選択的に阻害することで、Rb タンパクのリン酸化を阻害し、E2F を抑制させることによって細胞増殖を抑制するが、その他の作用機序はほとんど知られていない。本研究では、CDK が transforming growth factor (TGF)- $\beta$  ファミリーのサイトカインシグナル下流の転写因子 SMAD のリンカー領域をリン酸化するという既存の報告をもとに、Palbociclib が SMAD の機能へ何らかの影響を与えるものと予測し、Palbociclib が TGF- $\beta$  ファミリーの一つである Activin-SMAD シグナルへ与える影響を解明することを目的として研究を開始した。そして、Palbociclib が第二の作用機序として Activin-SMAD シ

グナルを増強することで細胞増殖を抑制する可能性を示した。さらに、Palbociclib が細胞増殖を抑制するうえで SMAD2 の標的遺伝子として *CCNG2* が重要であることを見出した。最後に、Activin-SMAD シグナルの腫瘍促進作用への影響についても言及した。

まず、HR 陽性乳癌細胞株 T47D 細胞を用い、BrdU 及び EdU 細胞増殖アッセイ、Fucci 導入細胞による細胞周期アッセイを行った。Activin、Palbociclib を投与することによって細胞増殖が抑えられ、また併用することで相加的に細胞増殖を抑制することを示した。

次に、CDK4/6 がリン酸化する SMAD2 のアミノ酸残基について検証した。免疫ブロッティングを行い、Palbociclib を投与することで SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化が阻害された。その阻害効果は Rb のリン酸化阻害効果と同程度であった。しかし、Palbociclib 投与による SMAD2 の核内移行への影響は明らかではなかった。

そこで、ChIP シーケンシング (ChIP-Seq) を行い、SMAD2 の結合領域に関する網羅的な解析を行った。Palbociclib を投与することで SMAD2 の結合箇所が増加し、それぞれの結合箇所でも SMAD2 の結合強度が増強していることがわかった。また、SMAD の標的遺伝子として代表的な *PMEPA1*、*CDKN2B* において SMAD2 の結合強度が増強した。結合領域のモチーフ解析では Palbociclib 投与・非投与いずれにおいても FOX ファミリーが上位にあがった。特に FOXA1 は ER 陽性乳癌のパイオニア因子として知られ、ER 陽性乳癌において FOXA1 が結合するエンハンサー領域に SMAD 複合体が結合している可能性が考えられた。

次に、T47D 細胞で RNA シーケンシング (RNA-Seq) によりトランスクリプトーム解析を行った。Palbociclib 投与・非投与下で培養後、それぞれに対し Activin 刺激・無刺激の 4 条件下で GSEA 解析を行い、Palbociclib と Activin が相加的に TGF- $\beta$ /Activin シグナルを増強することが示された。さらに、9 $\times$ CAGA ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいても同様に Palbociclib と Activin が相加的に TGF- $\beta$ /Activin シグナルを増強することが示された。RT-PCR による RNA 発現レベルの検討では SMAD の標的遺伝子である *PMEPA1*、*CDKN2B* が Palbociclib、Activin によって相加的に増加した。これに対し ALK4/5/7 阻害薬として SB431542

を投与し、TGF- $\beta$ /Activin 経路を遮断させたところ、*PMEPA1*、*CDKN2B* の発現は抑制された。

続いて、TGF- $\beta$ /Activin の作用のひとつである腫瘍促進作用への影響を検討した。RT-PCR において Palbociclib を投与することで EMT 関連遺伝子として代表的な *CDH1* (E-cadherin) がわずかに上昇したが、その他 *CDH2* (N-cadherin)、*ZEB1*、*FNI* (Fibronectin) は明らかな上昇を認めず、RNA-Seq の結果からも発現が極めて低かった。免疫ブロッティングでは E-cadherin の発現に明らかな変化はなく、N-cadherin、Fibronectin の発現は低かった。以上より、T47D 細胞において Palbociclib は Activin-SMAD シグナルを増強することによって細胞増殖抑制作用を増強する一方で、腫瘍促進作用への影響は明らかではなかった。

以上の結果から Palbociclib は Rb-E2F 経路に加え、Activin-SMAD 経路を介して細胞増殖抑制作用を増強している可能性が示唆された。そこで、ChIP-Seq の結果より Palbociclib を投与することで SMAD2 の結合強度が増強する領域を特定し、RNA-Seq による遺伝子発現プロファイリングデータを組み合わせて解析した。まず、ChIP-Seq より Palbociclib 投与によって SMAD2 の結合強度が 2 倍以上に増加するものは 3345 遺伝子であった。RNA-Seq では Palbociclib 投与によって RNA の発現が 2 倍以上に増加するものは 171 遺伝子、Activin A 刺激によって 2 倍以上に増加するものは 134 遺伝子であった。すべての条件を満たすものは 12 遺伝子あり、そのうち METABRIC による患者データによって ER 陽性癌の全生存期間において予後良好な因子となるものは *CCNG2*、*CLIC3*、*H3F3A* の 3 遺伝子であった。そこで、細胞周期に関連する Activin-SMAD2 の標的遺伝子として *CCNG2* に着目した。SMAD2 は *CCNG2* の転写開始点付近に結合し、Palbociclib 投与によって結合強度は増強した。RT-PCR では Palbociclib、Activin 投与によって相加的に mRNA の発現レベルが上昇した。T47D 細胞に *CCNG2* を強制発現させ、BrdU 細胞増殖アッセイを行ったところ、*CCNG2* 発現株ではコントロールと比較し、BrdU の取り込みを有意に減少させ、*CCNG2* は細胞周期の停滞を誘導すると考えられた。以上より、Palbociclib が Activin-SMAD シグナルを介して *CCNG2*

を誘導し細胞増殖抑制に関与している可能性が示唆された。

さらに、トリプルネガティブ乳癌細胞株Hs578T細胞を用いて、PalbociclibのActivin-SMADシグナルへの影響を検討した。まず、BrdU細胞増殖アッセイを行い、T47D細胞と等濃度のPalbociclibでは増殖抑制効果はみられなかった。次に、ChIP-Seqを行ったところ、T47D細胞と同様、Palbociclibを投与することでSMAD2のゲノム上への結合強度は増強し、SMADの標的遺伝子である*PMEPA1*で結合強度が増強した。さらに、9×CAGAルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてPalbociclibとActivinが相加的にTGF- $\beta$ /Activinシグナルを増強することがわかった。一方で、Hs578T細胞でもTGF- $\beta$ /Activinシグナルの増強によるEMTへの影響は明らかではなく、RT-PCRにおいてEMT関連遺伝子の発現変化は有意ではなかった。しかし、T47D細胞、Hs578T細胞いずれにおいてもEMT関連遺伝子*SNAIL*、*ZEB1*においてPalbociclib投与によりSMAD2の結合強度の増強がみられ、腫瘍促進作用を増強する可能性は否定できない。

以上より、HR陽性乳癌においてPalbociclibはActivin-SMADシグナルの細胞増殖抑制作用を増強することを示した。また、PalbociclibとActivinが相加的に細胞増殖を抑制するうえで、SMAD2の標的遺伝子として*CCNG2*が重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに、2つの異なる乳癌サブタイプの細胞株において、PalbociclibがSMAD2のゲノム上への結合を増強することを示した。本研究ではPalbociclibのEMTへの関与は明らかではなかったが、今後Palbociclibを投与するうえでActivin-SMADシグナルの腫瘍促進的な側面を増強する可能性について考慮すべきと考えられた。